

D- 4777

*Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Anatomický ústav
Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku*



MUDr. Zdeněk Čada

**GLYKOBIOLOGIE NÁDORŮ
HLAVY A KRKU**

Autoreferát disertační práce



Praha 2009

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České Republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Autor: MUDr. Zdeněk Čada

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

Školitel konsultant: As. MUDr. Jan Plzák, Ph.D.

Oponenti:

Autoreferát odeslán dne:

Obhajoba se koná dne:.....v.....hod.

Kde.....

**S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské
fakulty Univerzity Karlovy**

OBSAH

Souhrn.....	3
Summary.....	4
1. Úvod.....	5
1.1. Dlaždicové karcinomy hlavy a krku.....	5
1.2. Galektiny	5
1.3. Epidermová kmenová buňka, nukleostemin.....	6
1.4. Nádor a nádorové stroma, epitelomezenchymální transformace..	8
2. Cíle disertační práce.....	10
3. Materiál a metodika.....	11
3.1. Použitý biologický materiál.....	11
3.2. Kultivace buněk.....	11
3.3. Imunohistochemie.....	12
3.4. Lektinová histochemie.....	14
4. Výsledky a diskuze.....	14
4.1. Galektin-7.....	14
4.2. Nukleostemin.....	15
4.3. Interakce stromálních a epitelových buněk <i>in situ</i> a <i>in vitro</i> , nádorové stroma, epitelomezenchymová transformace	16
5. Závěr.....	18
7. Použitá literatura.....	19
8. Publikační činnost.....	21

SOUHRN

Nádory hlavy a krku představují kolem 5% všech nádorů. Naprostou většinu (90%) tvoří dlaždicové karcinomy vycházející ze sliznic horních cest dýchacích a polykacích. Navzdory diagnostickým i terapeutickým pokrokům zůstává prognóza pacientů s karcinomy hlavy a krku vážná. Proto je nutné hledat nějaké prognostické faktory, které by lépe charakterizovaly tyto nádory. Jedním z těchto znaků by mohly být endogenní lektiny zvané galektiny. V patologii dlaždicových karcinomů hlavy a krku se nejvíce uplatňují galektin-1, -3 a -7. Galektin-7 se uplatňuje v procesech regulace proliferace, apoptózy a stratifikace dlaždicových epitelů. Zjistili jsme určitou korelaci mezi expresí galektinu-7, diferenciací a přítomností keratinizace v dlaždicových karcinomech hlavy a krku. Dalším znakem, který by mohl lépe charakterizovat tyto znaky je jadérový protein nukleostemin. Zjistili jsme přítomnost nukleosteminu v dlaždicových karcinomech hlavy a krku. Velikost nukleostemin pozitivních jadérek odrážela určitý proliferační stav buněk nádorů. Ačkoliv je nukleostemin popisován jako znak některých kmenových buněk, z našich výsledků nemůžeme tuto hypotézu potvrdit u epidermové kmenové buňky.

Fibroblasty připravené ze stromatu dlaždicového karcinomu ovlivňují fenotyp normálních keratinocytů u nichž jsme detekovali znaky epidermové kmenové buňky. Tyto fibroblasty by mohly ovlivňovat biologické vlastnosti nádorů tohoto typu.

SUMMARY

Cancers of head and neck represents about 5% of all tumors. 80 to 90% of these tumors are constituted of squamous cell carcinomas. Despite a rapid progress in diagnostics and therapy the overall 5-year survival of this type of cancer is among the lowest of the major cancer types. This unfavourable situation needs the extensive research to found new markers to better characterize biological behavior of tumors as a rational background for more sophisticated therapeutic modalities. One of the most promising markers are endogenous lectins called galectins and their ligands. Especially galectin-1, -3 and -7 play a key role in pathology of squamous cell carcinomas. Galectin-7 is described in literature as a protein which has anti and pro-malignant features in different *in vitro* models. We studied tissue sections immunohistochemically and disclosed a correlation to increased status of differentiation and keratinization in head and neck squamous cell carcinomas. Other marker which could better characterize the tumors is nucleolar protein nucleostemin. We proved that presence of nucleostemin was documented in head and neck cancer, and its detection, together with the size properties of positive nucleoli, may relate to tumor cell features. Although nucleostemin is described as a marker of stem cells (e.g. neural or hematopoietic stem cells), we cannot consider this protein as reliable marker of epidermal stem cells, because it is expressed by suprabasal, terminally differentiated keratinocytes. The fibroblasts prepared from stroma of squamous cell carcinoma influence the phenotype of normal human epidermal keratinocytes to be similar to epidermal stem cell. These fibroblasts can participate in the control of biological properties of this type of cancer.

1. Úvod

1.1 Dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku

Dlaždicové karcinomy hlavy a krku představují kolem 5% všech tumorů. Naprostou většinu z nich (90%) tvoří dlaždicové karcinomy vycházející ze sliznic horních cest dýchacích a polykacích. Z klinického hlediska se dělí především dle lokalizace na karcinomy dutiny ústní, orofaryngu, epifaryngu, hypofaryngu, dutiny nosní, hrtanu a slinných žláz. Jedním z nejvíce rizikových faktorů pro vznik těchto nádorů je kouření. Více než 80% nádorů hlavy a krku je spojeno s expozicí tabákovému kouři (Myers et al., 2003). Dlaždicové karcinomy hlavy a krku se nejčastěji vyskytují v orofaryngu a laryngu a jsou charakterizovány lokálním agresivním chováním a časným metastazováním do regionálních uzlin. Navzdory diagnostickým i terapeutickým pokrokům zůstává stále prognóza pacientů s karcinomy hlavy a krku vážná. Při léčbě je nutné zachování dostatečné radikality a zároveň ochrana pacientů před zbytečně agresivními postupy, které zhoršují funkční výsledky (Chiesa et al., 1999, Ogawa et al., 1999).

1.2 Galektiny

Galektiny patří mezi endogenní lektiny dříve nazývané S-lektiny, které jsou charakterizovány vysoce konservativní CRD (karbohydrát rozeznávající doména) a afinitou k β -galaktosidům. Doposud bylo popsáno minimálně 14 zástupců rodiny galektinů. Dle struktury se dají rozdělit do 3 skupin.

1. „Prototype“ (galectin -1,- 2, -5, -7, -10, -11, -13, -14) .

2. „Tandem repeat“ (galektin -4, -6, -8, -9, -12).

3. „Chimera typ“-CRD (galektin-3) .

Galektiny se uplatňují v široké škále biologických dějů, kde se podílejí na regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy a modulaci mezibuněčné interakce a interakce s extracelulární matrix a to jak v normě, tak i za patologických stavů. K nejvíce prozkoumaným galektinům ve vztahu ke kancerogenezi patří galektin-1, galektin-3 a galektin-7, který byl centrem zájmu této disertační práce.

Galektin-7 představuje endogenní lektin prototypního typu exprimovaný ve všech vrstvách dlaždicového epitelu. Za fyziologických podmínek se uplatňuje v procesech regulace proliferace, apoptózy a stratifikace dlaždicových epitelů. Předpokládá se, že hraje důležitou roli v embryonálním vývoji vrstevnatých epitelů (Magnaldo et al., 1998, Timmons et al., 1999). Tyto výsledky naznačují, že galektin-7 by mohl být dobrým markerem normální stratifikace dlaždicových epitelů. Velice zřídka je detekován v bazocelulárních karcinomech (Chovanec et al., 2005). Zvýšená exprese mRNA byla zaznamenána u linie keratinocytů po expozici UVB záření a po aplikaci prodiferenciačních činidel (Bernerd et al., 1999). Je proto popisován jako p53 indukibilní gen 1 a jeho podíl na spuštění apoptózy, zejména u buněk s poškozenou DNA je zřejmý. Expres tohoto lektinu v dlaždicových karcinomech je popisována s rozdílnými výsledky a prognostickými výhledy pro pacienta (Saussez et al., 2006).

1.3 Epidermová kmenová buňka

V poslední době vzrostl velký zájem o studium epidermových kmenových buněk pro jejich možné využití např. v rekonstrukci poškozených tkáních.

Kromě role v procesu hojení se tyto buňky nejspíše také uplatňují v procesu kancerogeneze.

Centrem zájmu řady výzkumných skupin je najít specifické znaky nebo jejich kombinace charakterizující epidermální kmenové buňky. Mezi takové znaky patří β 1-integrin, protein p63, β -katenin a také galektin-1.

Nukleostemin je jaderný a jadéřkový protein vyskytující se v kmenových buňkách stromatu kostní dřevě, v nervových a hematopoetických kmenových buňkách (Lacina et al., 2006, Tsai et al., 2002, Yaghoobi et al., 2005). Proto se tento protein stává zájmem u studia kmenových buněk, včetně epidermálních kmenových buněk.

Expres nukleosteminu je typická pro ranná stadia proliferace multipotentních buněk a klesá s postupnou diferenciací buněk. Nukleostemin se zřejmě uplatňuje v procesech řízení embryonálních, proliferčních, regeneračních dějů řízení apoptózy (Beekman et al., 2006). V dlaždicových epitelech byla exprese nukleosteminu pozorována v bazálních i suprabazálních postmitoticky aktivních buňkách. Přesto zvýšená exprese m-RNA byla zaznamenána microarray technologií v místě bulge, tedy v místě uložení epidermových kmenových buněk (Tumbar et al., 2004). V *in vitro* pokusech byla zjištěna exprese nukleosteminu pozitivních jadérek v kultuře keratinocytů z vlasového folikulu kokultivovaných s feederem z mesenchymálních nenádorových buněk, nebyla prokázána v kultuře z interfolikulárních buněk (Lacina et al., 2006). Zajímavé je, že nebyla prokázána závislost mezi expresí nukleosteminu a keratinu-19, jenž je považován za jeden ze znaků epidermálních kmenových buněk (Lacina et al., 2006).

1.4 Nádorové stroma, epitelomezenchymová transformace

Solidní nádory se skládají ze dvou základních komponent, z vlastních nádorových buněk-parenchymu a z nádorového stromatu. V případě epitelových nádorů, které jsou centrem našeho zájmu, je stromální komponenta zpravidla oddělená od vlastních nádorových buněk bazální laminou, která bývá velmi často neúplná či chybějící.

Stromální komponenta je přítomna již při velikosti tumoru kolem 1-2 mm. Nádorové stroma obsahuje řadu buněk. Nejvíce zastoupenou skupinou buněk představují fibroblasty, žírné buňky, endotelové buňky, adipocyty, makrofágy a buňky imunitního systému. Kromě buněčných elementů se zde nacházejí i cévy, produkty rozpadu buněk, plasmatické proteiny, proteoglykany, glykosaminoglykany, fibrin, kolagen (především typ I, III), fibronektin, fibroblasty aj. Ačkoliv většina těchto buněk a složek extracelulární matrix je původem z nemaligních tkání, jejich vzájemné interakce mezi sebou a vlastním nádorem vedou k udržování funkčního maligního fenotypu s přítomnými interakcemi buňka-buňka, buňka-extracelulární matrix a produkty transformovaných a netransformovaných buněk, mezi které patří různé typy chemokinů, cytokinů a růstových faktorů (Kulbe et al., 2004).

Nejpočetnější buněčnou populací v nádorovém stromatu představují fibroblasty, jejichž jednotlivé zastoupení v nádorech se liší. Obecně se tyto fibroblasty označují tumory asociující fibroblasty (CAFs-cancer associated fibroblasts), pro které je charakteristické vedle vřetenovitého tvaru exprese α -SMA. Rozdíl mezi těmito a normálními fibroblasty je, že CAFs jsou trvale aktivovány, nekonvertují zpět na normální fibroblasty a nepodléhají klasické apoptóze (Li et al., 2007). Původ tumor asociujících fibroblastů,

není stále jasný. Je několik teorií, které se snaží vysvětlit jejich původ. Jedna z nich uvažuje o fúzi nádorových buněk s pozičně blízkými rezidentními fibroblasty (Duelli a Lazebnik 2003), jiná teorie zvažuje jejich původ z CAFs prekurzorů buněk aktivované kostní dřeně a konečně se velmi intenzivně studuje teorie epitelomezenchymální transformace (EMT). EMT bychom mohli definovat jako přechod epitelové komponenty do stavu fenotypově odpovídající mesenchymu s paralelní expresí vimentinu a ztrátou exprese E-cadherinu.

Jak již bylo výše zmíněno EMT může být objektivizována změnou a expresí molekulárních markerů. Obecně uznávanými markery EMT je zvýšená exprese N-kadherinu, vimentinu, jadéřková lokalizace β -kateninu, zvýšená produkce transkripčních faktorů jako Snail 1 (Snail), Snail 2 (Slug), EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, E47.

Oblasti epitelomezenchymového přechodu je možné dle některých prací definovat jako přítomnost buněk s koexpresí vimentinu a cytokeratinů s paralelní expresí transkripčního faktoru Snail (Huber et al., 2004, Petersen et al., 2003). Jiné studie poukazují na místo EMT se zvýšenou expresí Snail a sníženou expresí E-cadherinu (Yokoyama et al., 2003).

Důležitou otázkou je, zdali CAFs jsou schopné nějakým způsobem ovlivňovat biologickou aktivitu vlastní transformované či netransformované tkáně.

V procesu kancerogeneze by mohla EMT dle některých literárních údajů hrát velkou roli. (Li et al., 2007).

2. CÍLE PRÁCE

- Glykobiologická charakterizace dlaždicových karcinomů hlavy a krku zejména z hlediska exprese vybraných galektinů ve srovnání s normálními tkáněmi v korelaci s výskytem funkčně významných jaderných a cytoplasmatických proteinů.
- Exprese nukleostemínu v dlaždicových karcinomech hlavy a krku a jeho korelace s expresí znaků charakterizující epidermální lmenové buňky.
- Objasnění funkce, vzniku a původu nádorově asociovaných stromálních fibroblastů stromatu jako niche pro nádorovou kmenovou buňku.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Použitý biologický materiál

Všechny vzorky byly odebírány s příslušným informovaným souhlasem pacienta.

Vzorky normální epidermis, bazocelulárních karcinomů a dlaždicových karcinomů pocházely převážně z Dermatovenerologické kliniky 1.LF UK a VFN v Praze 2, z kliniky ORL a chirurgie hlavy a krku 1.LF UK a FN v Motole, Praha 5 a z Kliniky plastické chirurgie 3. LF UK a FN Královské Vinohrady .

3.2. Kultivace buněk

Vzorky normální kůže a nádorů byly odebrány přímo na operačním sále a uloženy do transportního kutivačního média s přidavkem antibiotik (penicilin, streptomycin- Sigma Aldrich, Praha, ČR) a antimykotik (amfotericin B- Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a převezeny do laboratoře na Anatomickém ústavu, kde vzorky byly enzymaticky rozvolněny roztokem trypsinu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a ethylendiamintetraoctové kyseliny-EDTA (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Z epidermis byla získaná primární kultura interfolikulárních keratinocytů, z dermis kultura folikulárních keratinocytů a fibroblastů. Ze vzorků bazocelulárních a dlaždicových karcinomů byly připraveny primokultury stromálních fibroblastů a keratinocytů. Dále jsme použili linie myších embryonálních fibroblastů 3T3, linie FaDu-původně izolovaná ze dlaždicového karcinomu hypofaryngu a buněčné linie TC-1 původně získané transformací epiteliální myší linie C57BL/6 pomocí HPV 16 E6/E7 a aktivovaného H-ras

proonkogenů. Linie 3T3 buněk jsme použili jako podpůrnou půdu pro kultivaci keratinocytů. Před nasazením 3T3 buněk ve vhodné hustotě ke kokultivaci s keratinocyty jsme použili Mytomycin k zastavení jejich proliferační aktivity. Buňky byly ko-kultivovány v médiu HMEM

(Sevapharma, Praha, ČR) s 10% bovinním sérem (ZVOS, Hustopeč, ČR) a se zvýšenou tenzí CO₂ (3,3%). Vedle 3T3 linií jsme jako podpůrné fibroblastové buňky použili linie dermálních lidských fibroblastů, fibroblasty izolované z karcinomů a TC1 buněk, jež byly kultivované v DMEM médiu (Biochrom, Berlín, NSR) s 10% fetálním bovinním sérem (Biochrom, Berlín, SRN) při 37 °C a 5% tenzi CO₂. Výše zmiňovaná linie Fadů byla kultivována ve EMEM médiu (Biochrom, Berlín, SRN) s 10 % fetálním bovinním sérem při 37 °C a 5% tenzi CO₂.

Jednotlivé buňky (mezenchymové buňky/keratinocyty) byly studovány jak ve 2D prostoru po nasazení na krycí skla nebo ve 3D rostoru po nasazení do Matrigelu (BD, Biosciences Erembodegen, Belgie). Jednotlivé interakce epitelových a mezechymových buněk byla studována buď v přímém vzájemném kontaktu nebo v systému Insert (BD-Falcon, Franklin Falls, USA), který umožňuje za pomoci mikroporózní membrány studovat vzájemnou interakci dvou buněčných populací pomocí solubilních faktorů, pronikající přes mikroporózní membránu, aniž by došlo k jejich vzájemnému fyzickému kontaktu.

3.3. Imunohistochemie

Vzorky normálních i nádorových byly po odběru ihned ještě na operačním sále upraveny na vhodnou velikost cca 5x5x5mm a ponořeny do zmrazovacího média Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, Nizozemí). Po 60 minutách, kdy byl vzorek uložen při teplotě +4°C, bylo provedeno rychlé zmrazení v tekutém dusíku a dále byl vzniklý bloček uchován při teplotě -

80°C do definitivního zpracování. Zmražená tkáň byla následně nakrájena na kryostatu Cryocut-E (Reichert-Jung, Vídeň, Rakousko) na řezy o síle 7 μm. Tyto byly přeneseny na skla s povrchem modifikovaným poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich, Praha, ČR).

Získané kultury rostoucí na krycích sklech byly po opakovaném opláchnutí v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) rychle usušeny v laminárně proudícím vzduchu a uchovávány do definitivního zpracování v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Kultury v Matrigelu byly po odsátí kultivačního média bleskově zmrazeny v tekutém dusíku a tovněž uchovávány do definitivního zpracování při teplotě -80°C, kdy byly nakrájeny na kryostatu. Před vlastním imunohisto- a cytochemickým zpracováním byly vzorky krátce fixovány v paraformaldehydu (2 % /w/v/ paraformaldehydu v PBS /pH 7.3/) a permeabilizovány za použití Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Bylo použito metody vícenásobného značení na úrovni jedné buňky. Nespecifická vazba protilátek druhého kroku byla blokována pomocí prasečího séra (DAKO, Brno, ČR). Po obarvení byl vzorek zamontován do média Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a hodnocení vzorků a měření bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu Optiphot-2 a později Nikon Eclipse 90i (Nikon, Praha, ČR). Analýza obrazu a měření fluorescenčních profilů bylo prováděno pomocí softwarového systému Lucia 3.2 respektive 5.1 (Laboratory Imaging, Praha, ČR). Výsledky byly hodnoceny Studentovým t-testem. Specificita imunohistochemické reakce byla ověřena nahražením protilátky prvního kroku jinou v dané tkáni se nevyskytující protilátkou. Barvení jaderné DNA bylo univerzálně prováděno pomocí DAPI (Sigma-Aldrich, Praha, ČR).

3.4. Lektinová histochemie

K detekci vazebných míst pro jednotlivé galektiny byly použity biotinylované galektiny, které připravil připravil H.-J. Gabius a S. André (Univerzita Ludwiga-Maximiliana, Mnichov), jako značení druhého kroku byl použit ExtrAvidin-TRITC (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Jako test specifické reakce při lektinové histochemii byl buď vypuštěn z protokolu biotinylovaný galektin, popřípadě byla provedena inhibice laktózou.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Galektin-7

Zjistili jsme, že výskyt galektinu-7 v dlaždicových karcinomech nebyl uniformní.

Statisticky nejvýznamnější korelace ($P=0,0105$) silné exprese galektinu-7 bez závislosti na homogenitě či heterogenitě signálu byla zaznamenána ve vztahu ke keratinizaci, kde silná exprese galektinu-7 byla detekována v rohových perlách tumoru s nejčastější lokalizací v centrálních partiích nádorů. Statisticky významná korelace ($P=0,0024$) byla rovněž zaznamenána mezi silnou homogenní expresí galektinu-7 a přítomností kontinuálně formované bazální laminy. Další statistická významnost byla potvrzena u silně homogenní exprese galektinu-7 a diferenciací nádoru ($P=0,0009$), kde tumory se silnou intenzitou signálu exprese galektinu-7 vykazovaly dobrou diferenciací (Grading-1 a 2). Vzhledem k některým publikovaným pracím (Saussez et al., 2006), které poukazují například na špatnou prognózu u pacientů s karcinomem hypofaryngu stádia IV s paralelně nízkou expresí galektinu-7, nebyla v našem souboru tato

závislost zjištěna. Zajímavým nálezem byla detekce galektinu-7 v jádrech buněk a to především v tumorech se silnou a homogenní expresí, což by mohlo souviset s určitou rolí galektinu-7 při sestřihu pre-mRNA, jako je tomu u galektinu-1 a 3 (Wang et al., 2004). Bohužel nebyla zaznamenána statistická závislost mezi expresí galektinu-7 a přežitím.

Závěrem je možné konstatovat, že z výsledků této práce není možné v tuto chvíli považovat galektin-7 za suverénní diagnostický a prognostický marker.

4.2. Nukleostemin

Zjistili jsme, že jadérová exprese nukleosteminu byla přítomna v kontrolních normálních sliznicích laryngu a orofaryngu, a to jak v bazálních tak suprabazálních vrstvách (Smetana et al., 2006), přičemž velikost jadérek byla v obou kompartmentech srovnatelná. Průměrná velikost plochy jadérek byla v rozmezí 6-10 μm^2 .

V dlaždicových karcinomech hrtanu, jazyka, orofaryngu, FaDu buněk a tumorech transplantovaných nu/nu myši jsme zaznamenali silnou expresi nukleosteminu v jadérech, jejichž velikosti nebyly tak uniformní ve srovnání s normálním epitelem, ale na druhou stranu byly daleko větší. Zjistili jsme jadérka i o velikosti plochy do 35 μm^2 . Současně s expresí nukleosteminu v jadérech jsme detekovali expresi β -kateninu, jehož jaderná exprese je popisována jako znak epidermální kmenové buňky (Smetana et al., 2006, Lacina et al., 2007). Zjistili jsme, že velikost jadérek v nukleostemin pozitivních buňkách s jadernou či cytoplasmatickou expresí β -kateninu byla ve srovnání s expresí β -kateninu na buněčné membráně vyšší. Zrovna tak jadérka keratin-10 negativních a nukleostemin pozitivních buněk byla větší ve srovnání s bunkami pozitivní na keratin-10. Na druhou stranu je třeba dodat, že jsme ojedinele našli buňky s velkou plochou

jader, které byly cytokeratin-10 pozitivní a současně se u nich vyskytovala membránová exprese β -kateninu. Tento stav by mohl být přirovnán k popisovanému výskytu disproporce mezi diferenciací a maturací v dlaždicových karcinomech objektivizovaný současnou expresí Ki-67 s markery charakterizující terminálně diferenciací stav buňky (Chovanec et al., 2005).

Ačkoliv je řadou autorů nukleostemin považován za marker kmenové buňky (Tsai et al. 2002, Yaghoobi et al., 2005) výsledky naší práce tuto hypotézu zatím nepodporují.

4.3. Interakce stromálních a epitelových buněk *in situ* a *in vitro*, nádorové stroma, epitelomezenchymová transformace

Zjistili jsme rozdílný fenotyp kolonií interfolikulárních epitelových buněk kokultivovaných s dermálními fibroblasty či s 3T3 buňkami a keratinocyty kokultivovanými s SCCF (fibroblasty připravené z dlaždicového karcinomu). Zatímco keratinocyty kokultivované s nenádorovými fibroblasty tvořily klasické ploché oválné kolonie, byly kolonie keratinocytů kokultivované se SCCF nepravidelné a s výskytem keratinocytů spíše podobných i fibroblastům. Vedle morfologických rozdílů jsme u těchto buněk zaznamenali expresi keratinu-8, který je u nádorových keratinocytů znakem agresivity a v mnoha případech signalizuje špatnou prognózu pacienta (Casanova et al., 2004, Raul et al., 2004). Je zároveň i znakem prekursorů epidermální kmenové buňky (Troy a Turksen 2005). Kromě toho jsme pozorovali i expresi keratinu-19 a přesun β -kateninu z membránové lokalizace do cytoplasmy. Tento fenotyp je popisován u velmi agresivních tumorů (Smetana et al., 2005, Morasso et al., 2005). Velmi zajímavým nálezem, který současně podporuje teorii vznik nádorového stromatu epitelomezenchymovým přechodem, bylo zjištění koexprese

vimentinu a keratinu v četných keratinocytech kokultivovaných se SCCF. Tato skutečnost byla podpořena i expresí transkripčního faktoru Snail, jenž tento proces řídí a je považován za znak přechodu epitelových buněk do fibroblastů (Thiery et al., 2003, Thiery a Sleeman 2006). Nutno však podotknout, že současnou expresí vimentinu a keratinu jsme ve velmi omezeném množství zaznamenali i v normálních keratinocytech kokultivovaných s dermálními a 3T3 fibroblasty.

Vzájemné interakce mezi SCCF a interfolikulárními epidermálními keratinocyty byly potvrzeny i expresí keratinu-8 a vimentinu v keratinocytech, jež byly kokultivované odděleně mikroporózní membránou od mesenchymálních buněk.

Dalším příkladem interakce mezenchymálních a epitelových buněk je možné uvést na příkladu fibroblastů izolovaných z benigního fibrózního histiocytomu (FBFH) a normálních keratinocytů. Toto pozorování ukázalo, že interakce nádorového epitelu a okolního mezenchymu hraje roli i u benigních nádorů a může vysvětlit hyperproliferační keratinocytů nad ložiskem tohoto typu nádoru.

K dalšímu důkazu vzájemné interakce stromálních a epitelálních buněk (normální folikulární-NHF, interfolikulární keratinocyty-NIF) byla použita geneticky upravená buněčná linie TC-1, která byla připravena transfekcí myších plicních epitelových buněk geny *E6/E7* lidského papilomaviru HPV16a genem pro *H-ras*. Tyto buňky lze považovat za model buněk vzniklé epitelomezenchymovou transformací buněk nádorových a hypoteticky se mohou podílet na vytváření bioaktivního stromatu. Kontrolu představovaly 3T3 myší fibroblasty kokultivované s výše zmiňovanými keratinocyty.

Rozdílly jsme opět zaznamenali v morfologii kolonií a expresí keratinu-8 a 19.

5. Závěr

- Exprese galektinu-7 v karcinomech hlavy a krku je heterogenní, s rozdílným rozložením a intenzitou signálu. Statisticky nejvýznamější korelace byla zaznamenána mezi silnou expresí galektinu-7, keratinizací, gradingem a přítomností dobře formované bazální membrány. Nebyla zaznamenána statistická závislost mezi expresí galektinu-7 a přežitím.
- Prokázali jsme, že exprese nukleosteminu není závislá na proliferačním stavu buňky, a to jak v normální-netransformované tkáni, tak v tkáni transformované. Dále jsme zaznamenali určitou korelaci mezi velikostí jadérek a nukleostemin-pozitivními nádorovými buňkami. Ačkoliv je nukleostemin považován řadou autorů za znak některých kmenových buněk (např. hematologických, nervových), z našich poznatků nelze tento protein považovat za znak kmenovosti v epitelových buňkách.
- Zjistili jsme, že izolované nádorové fibroblasty jsou schopné změnit fenotyp netransformovaných/normálních keratinocytů do podoby nádorových buněk. Zároveň jsme prokázali, že při vzájemných interakcích těchto buněk se v keratinocytech exprimují znaky, které jsou typické pro méně diferencované až kmenové buňky. Rovněž jsme nastínili možnost vzniku nádorového stromatu procesem epitelomezenchymové transformace.

7. LITERATURA

- Bernerd F, Sarasin A, Magnoldo T: Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Cell Biology*, 1999, 96, s. 11329–11334.
- Duelli D, Lazebnik Y. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell*. 2003, 3, s. 445-8.
- Dvorak H F, Nagy J A, Dvorak A M: Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies *Cancer Cells* 1991. 3, s. 77-85.
- Hughes R C: Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochemie*, 2001, 83, s. 667-676.
- Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni B C: Galectin genes: Regulation of expression. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 19, s. 441-449.
- Chovanec M, Smetana K Jr., Plzák J, Betka J, Plzáková Z, Štork J, Hrdličková E, Kuwabara I, Dvořánková B, Liu F-T, Kaltner H, André S, Gabius H-J: Detection of new diagnostic markers in pathology by focus on growth-regulatory endogenous lectins. The case study of galectin-7 in squamous epithelia. *Prague Med Rep.*, 2005, 106, s. 209-216.
- Lacina L, Smetana K Jr, Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kucerová L, Plzáková Z, Stork J, Gabius H-J and André S: Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Brit J Dermatol.*, 2007, 156, s. 819-829.
- Lacina L, Smetana K Jr., Dvořánková B, Štork J, Plzáková Z, Gabius H-J, Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: Marker of epidermal stem cells?, *Journal of Dermatological Science*. 2006, 44, s.73-80.
- Magnaldo T, Fowles D, Darmon M: Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation*, 1998, 63, s. 159-168.

- Myers E N, Suen J Y, Myers J N, Hanna E Y N, Cancer of the head and neck, Saunders, 2003.
- Ridanpaa M, Fodde R, Kielman M: Dynamic expression and nuclear accumulation of b-catenin during the development of hair follicle-derived structures. *Mech. Dev.*, 2001, s. 173–181.
- Saussez S, Cucu D R, Decaestecker C, Chevalier D, Kaltner H, Andre S, Wacreniez A, Toubeau G, Camby I, Gabius H-J, Kiss R: Galectin 7 (p53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer. *Ann Surg Oncol.*, 2006, 13, s. 999-1009.
- Smetana K, Jr., André S: Mammalian lectin as tool in glycochemistry and histochemistry with relevance for diagnostic procedure. In McMahn, R.J. (Ed.) *Avidin-Biotin Interactions, Methods and Applications*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2008, s. 171-185.
- Smetana K Jr., Dvořánková B, Chovanec M, Bouček J, Klíma J, Motlík J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius J-H: Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal /malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem Cell Biol.*, 2006, 125, s.171-182.
- Thierry J P, Sleeman J P: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2006, 7, s. 131-142.
- Timmons M P, Colnot C, Cail I, Poirier F, Magaldi T: Expression of galectin-7 during epithelial development coincides with the onset of stratification. *Int. J. Dev. Biol.*, 1999, 43, s. 229-235.
- Tsai R Y L, McKay R D G: A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Develop.*, 2002, 16, s. 2991-3003.
- Wang J L, Gray R M, Haudek K C, Patterson R J. Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1673, s.75-93.

8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

a) SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ TÝKAJÍCÍ SE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Čada Z, Bouček J, Dvořánková B, Chovanec M, Plzák J, Kodet R, Betka J, Pinot G L, Gabius H-J, Smetana K Jr. Nucleostemin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Anticancer Research*, 2007, 27, s. 3279-3284. **(IF 1.604)**
2. Lacina L, Dvořánková B, Smetana K Jr, Chovanec M, Plzák J, Tachezy R, Kideryová L, Kučerová L, Čada Z, Bouček J, Kodet R, André S, Gabius HJ: Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiation Biol.*, 2007, 83, s. 837-848. **(IF 1.468)**
3. Smetana K Jr, Dvořánková B, Lacina L, Čada Z, Vonka V. Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: An in vitro study. *Oncol Rep.*, 2008, 20, s. 75-80. **(IF 1.597)**
4. Čada Z, Plzák J, Chovanec M, Dvořánková B, Lacina L, Szabó P, Smetana K., Jr., Betka J: Galectiny v dlaždicových karcinomech hlavy a krku. *Časopis lékařů českých*, 2008, č. 11, s. 559-563.
5. Čada Z, Chovanec M, Smetana K Jr., Betka J, Lacina L, Plzák J, Kodet R, Štork J, Lensch M, Kaltner H, André S, Gabius HJ. Galectin-7: Will the lectin's activity establish clinical correlations in head and neck squamous and basal cell carcinomas? *Histol Histopathol.*, 2009, 24, s. 41-48. **(IF 2.007)**
6. Kideryová L, Lacina L, Dvořánková B, Štork J, Čada Z, Szabo P, Andre S, Kaltner H, Gabius HJ, Smetana K Jr: Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form its malignant form and to normal fibroblasts. *J Dermatol Sci.*, 2009, in press **(IF 2.515)**

7. Čada Z, Smetana K.Jr., Lacina L, Plzáková Z, Štork J, Kaltner H, Russwurm R, Lensch M, André S, Gabius HJ. Immunohistochemical fingerprinting of the network of seven adhesion/growth-regulatory lectins in human skin and detection of distinct tumor-associated alterations. Folia Biologica, 2009, in press. 1,140

b) SEZNAM PUBLIKACÍ NEVZTAHUJÍCÍ SE K DISERTAČNÍ PRÁCI

Čada Z, Klozar J, Chovanec M, Plzák J. Rizikové faktory a prognostický význam komplikací po totální laryngektomii. Otorinolaryng. a Foniat., 2009, č. 1, s. 3-7.